

ABSTRACT  
JP 4-315048

-1- (JAPIO)

ACCESSION NUMBER 92-315048

TITLE DETECTION OF AMINE

PATENT APPLICANT (0000000) UCHIKURA KAZUO

INVENTORS UCHIKURA, KAZUO

PATENT NUMBER 92.11.06 J04315048, JP 04-315048

APPLICATION DETAILS 91.04.12 91JP-108424, 03-108424

SOURCE 93.03.23 SECT. P, SECTION NO. 1506; VOL. 17, NO.

141, PG. 114.

INT'L PATENT CLASS G01N-031/00; G01N-021/76; G01N-031/22

JAPIO CLASS 46.2 (INSTRUMENTATION--Testing); 14.4 (ORGANIC CHEMISTRY--Medicine)

ABSTRACT

PURPOSE: To detect alicyclic secondary or tertiary amine or an indole compound by subjecting a complex of a transition metal element and bipyridine to electrolytic oxidation to increase the oxidation number of the transition metal element and bringing this oxide into contact with alicyclic tertiary amine to generate chemical luminescence.

CONSTITUTION: A reagent solution containing a bipyridine complex of a transition metal and a sample solution containing alicyclic tertiary amine or an indole compound are respectively supplied by pumps 11, 13 through damper tubes 15, 17. The reagent solution is continuously subjected to electrolytic oxidation by an electrolytic reactor 23 equipped with a stabilized DC power supply 21 to be supplied to a detector 25. A definite amount of the sample solution is injected in a carrier solution from an injector 31 to be supplied to the detector 25. The carrier solution containing a sample and the reagent solution are mixed and reacted in the detector 25 and the complex of the transition metal and bipyridine is subjected to electrolytic oxidation to increase the oxidation number of the transition metal element and, subsequently, this oxide and alicyclic tertiary amine are brought to a contact state to generate chemical luminescence. Next, luminescence is detected by the detector 25 to be recorded on a recorder 27.

AL

(51) Int. Cl.

G 0 1 N 31/00

21/76

31/22

識別記号

V

1 2 2

庁内整理番号

9015-2 J

7235-2 J

9015-2 J

F I

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全 8 頁)

(21) 出願番号

特願平3-108424

(22) 出願日

平成3年(1991)4月12日

(71) 出願人 591099072

内倉 和雄

神奈川県横浜市港南区野庭町194番地

(72) 発明者 内倉 和雄

神奈川県横浜市港南区野庭町194番地

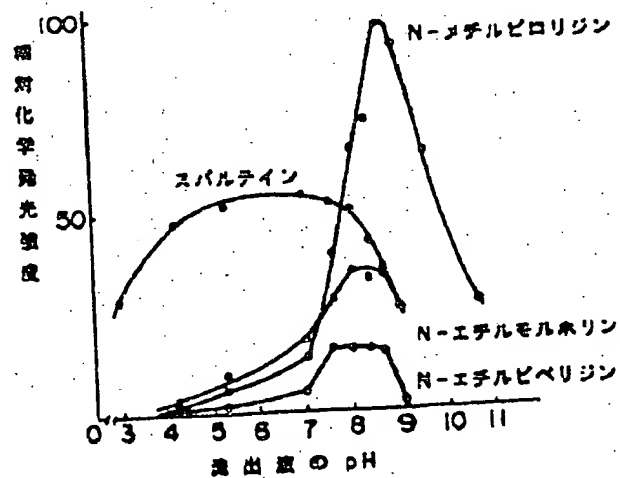
(74) 代理人 井理士 白村 文男

(54) 【発明の名称】 アミンの検出方法

(57) 【要約】

【構成】 Ru(II)のピリジン錯体を連続的に電解酸化しRu(III)として反応槽に供給し、この酸化体と脂環式三級アミンまたはインドール化合物を反応させる。Ru(III)がRu(II)に還元される際に発光が認められる。高速クロマトグラフィーのポストカラム検出法に適用できる。

【効果】 電解化学発光を利用して、アルカロイド、抗生物質、トリプトファン等の化合物群を含む脂環式三級アミンおよびインドール化合物を、高い選択性でピコモルレベルで検出できる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 遷移金属とピリジンとの錯体を電解酸化して遷移金属元素の酸化数を増加させ、ついで、この酸化体と脂環式三級アミンとを接触させて化学発光せしめることを特徴とする脂環式三級アミンの検出方法。

【請求項2】 脂環式二級アミンと活性ビニル基を有する三級化剤とを反応させて脂環式三級アミンとし、一方、遷移金属とピリジンとの錯体を電解酸化して遷移金属元素の酸化数を増加させ、ついで、この酸化体と上記脂環式三級アミンとを接触させて化学発光せしめることを特徴とする脂環式二級アミンの検出方法。

【請求項3】 遷移金属とピリジンとの錯体を電解酸化して遷移金属元素の酸化数を増加させ、ついで、この酸化体とインドール化合物とを接触させて化学発光せしめることを特徴とするインドール化合物の検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、含窒素化合物である脂環式三級アミン、脂環式二級アミンおよびインドール化合物を電解化学発光反応を利用して検出する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 含窒素有機化合物には、アルカロイド、抗生物質、医薬品、トリプトファン等の必須アミノ酸、その代謝産物であるインドールアミンなど生理活性を示すものが多数存在し、生物化学、植物化学等の広い分野で興味をもたれている化合物群である。それゆえに、これらを分析、検出するために、官能基としての窒素元素に注目し、種々の検討がなされてきた。特に、一般および二級アミンについては多くの分析法が見い出され有用な方法も少なくないが、三級アミンの検出法としてはその化学的反応性の低さ等から十分満足できるものはない。

【0003】 一方、最近においては、発光反応に基づく分析法が、吸光度法や蛍光法に比較して高感度であり、定量範囲の広さ、発光反応時間の短さによる応答速度の速さ等によって流通系における検出手段として注目され、新しい高感度検出法として広範な化合物に適用されている。また、近年、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や連続流れ分析法 (FIA: Flow Injection Analysis) に容易に適用できる化学発光検出器が開発、市販されるに至って、種々の測定に利用されている。

【0004】 発光には、化学発光、生物発光などに基づくものがあるが、現在、分析法としては、化学発光 (Chemiluminescence, CL) を利用したものが多く、アシルヒ

ドラジド類 (ルミノール、イソルミノール)、アクリジニウム塩、エステル (ルシゲニン、N-メチルアクリジン)、シュウ酸エステル (TCPO) 等が発光物質として知られている。一方、電解で生成したイオン種 (活性種) の反応によって発光する電解化学発光 (electrogenerated chemiluminescence, ECL) 系は選択性、特異性に優れているが、日常の分析法として利用されているものはほとんどない。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、脂環式二級または三級アミンあるいはインドール化合物を ECL 検出法を応用して検出することを目的とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、遷移金属とピリジンとの錯体を電解酸化して遷移金属元素の酸化数を増加させ、ついで、この酸化体と脂環式三級アミンまたはインドール化合物とを接触させて発光せしめることにより、これら含窒素化合物を検出するものである。

【0007】 また、脂環式二級アミンに活性ビニル基を有する三級化剤を反応せしめて脂環式三級アミンとし、これに上記検出方法を適用することにより、結果として脂環式二級アミンを検出することもできる。

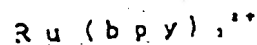
## 【0008】

【発明の実施態様】 本発明で検出用試薬として用いられる遷移金属とピリジンとの錯体における遷移金属としては、ルテニウム (Ru)、クロム (Cr)、コバルト (Co)、ロジウム (Rh)、オスミウム (Os) などが挙げられる。特にルテニウムまたはクロムとピリジンとの錯体が好ましい。

【0009】 この遷移金属とピリジンとの錯体の発光機構について、一例としてトリス (2, 2'-ピリジン) ルテニウム (II) 錯体 (以下、化1の如く示す) を取り上げて示す。

## 【0010】

## 【化1】

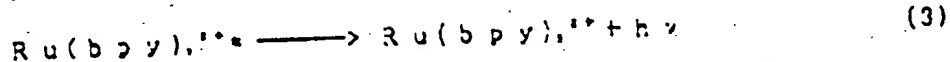
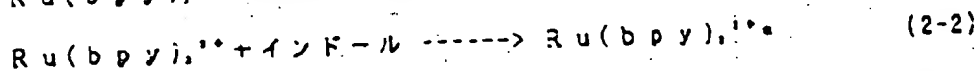
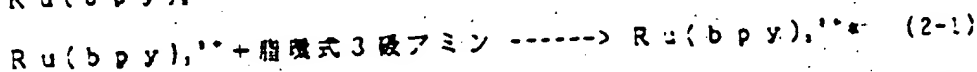
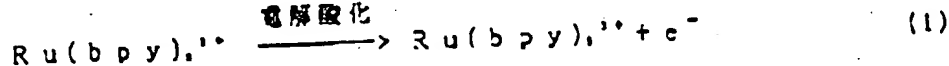


【0011】 ルテニウムが2価の  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  錯体は、下記数1に示したように電解されてルテニウムが3価の  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  錯体となり(1)、これが脂環式三級アミンまたはインドール類により還元され、励起状態の2価錯体 (\* で表示、2-1、2-2) を経て基底状態の2価錯体となるときに発光する(3)ものと考えられる。

## 【0012】

## 【数1】

## 電解酸化

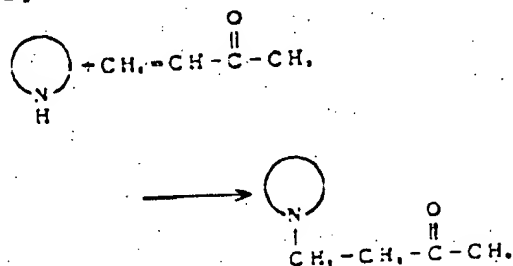


【0013】ここで発光のためには、励起状態の錯体を生成することが重要であり、多くの還元性物質、無機塩、芳香族アミン（インドールは例外）等では反応するが発光を示さず、本発明の方法は高い選択性を示す。

【0014】また、脂環式二級アミンは、活性ビニル基を有する三級化剤と反応させて脂環式三級アミンとしたのち、上記と同様にして検出することができる。例えばビニルメチルケトン、脂環式二級アミンと数2のように速やかに反応し、しかも水溶液中でこの反応が進行するので、検出に先立つての前処理が容易である。

【0015】

【数2】



【0016】そこで、試料を上記の如く三級化処理し、本発明方法を適用し、ピーク強度の増大および新たな発光ピークの出現等によって、脂環式三級アミンと二級アミンの同時分析が可能である。活性ビニル基を有する三級化剤としては、上記のビニルメチルケトンの他に、ビニルスルホン酸、ビニルスルホンなどが例示される。

【0017】脂環式三級アミンとしては、N-エチルモルホリン、N-メチルピロリジン、N-エチルピペリジンのような比較的単純な化合物の他、図1に構造式を示したスバルテイン（脂環式三級アミン窒素を矢印で表示）等のアルカロイド、リンコマイシン（図2）等の抗生物質、医薬品などの検出に応用できる。

【0018】また、インドール化合物としては、インドールの他に、トリプトファン等の各種インドール誘導体を検出できる。

【0019】電解酸化により得られるピリジン錯体の酸化体は、水溶液中で不安定なので、遷移金属のピリジン錯体を含む溶液を連続的に電解酸化装置に供給し、得られた酸化体をすみやかに連続的に反応槽に供給して脂環式三級アミンまたはインドール化合物と反応せしめる。

【0020】図3は、本発明の検出方法を実施する装置の一例を示す説明図である。遷移金属のピリジン錯体

を含む試薬溶液と脂環式三級アミンまたはインドール化合物を含む試料溶液とは、それぞれポンプ11,13によりダンパチューブ15,17を経て供給される。ダンパチューブ15,17は、長い細管（例えば20m程度）からなり、ポンプ11,13の脈動を吸収して、滑らかに連続的に試薬溶液およびキャリア溶液を後段に供給するためのものである。

【0021】試薬溶液は、安定化直流電源21を具えた電解反応器23（電解酸化装置）により連続的に電解酸化されて検出器25に供給される。一方、キャリア溶液には、インジェクタ31から一定量の試料溶液が注入され、検出器25に供給される。検出器25内で試料を含むキャリア溶液と試薬溶液とが混合されて反応し、前述の発光が起こる。この発光が検出され、レコーダ27に記録される。

【0022】脂環式三級アミンおよびインドールはpmol（ピコモル）でも検出することができる。図4は、分離系と組み合わせて本発明を実施する場合の一例を示す説明図であり、分離系としてHPLCを用いている。

【0023】インジェクタ31から一定量の試料溶液がHPLCのカラム33に注入され、ついで、ポンプ41により溶離液（移動相溶媒）をカラム33に送液する。試料溶液中の混合物試料は各成分に分離され、溶離液（キャリア溶液）に運ばれて検出器25に供給される。

【0024】これにより、血液等の混合物中の脂環式三級アミンおよびインドール化合物を、それぞれの成分に分離して検出することができる。

【0025】

【発明の効果】本発明によれば、遷移金属のピリジン錯体の電解化学発光を利用することにより、脂環式三級アミンまたはインドール環を含む含窒素化合物を、高い選択性で共存物質の影響を比較的受けずにpmolレベルで検出することができる。

【0026】よって、一般の含窒素化合物はもちろんのこと、アルカロイド、抗生物質、医薬品などの検出に応用でき、また、高能率な分離系であるHPLC検出法への適用も容易である。

【0027】

【実施例】

実施例1

図3に示した装置を用い、試料溶液としては表1および表2に示した各化合物を水または水-メタノール混液（1:1, v/v）にして10μMにしたものを用いた。キャリア溶液として、水または10mMリン酸緩衝液-メタノール

ル(1:1, v/v)混液を0.8ml/minで送液し、検出器25 (日本電子(株), LC30-DPC)に供給した。

【0028】一方、試薬溶液としてトリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム(II)塩酸塩[Ru(bpy)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>]を10mM硫酸に溶解して0.3mMとしたものを、0.3ml/minで送液して電解反応器23に供給し、80μAで連続的に定電流電解してRu(II)をRu(III)に酸化し、検出器25に供給した。

【0029】インジェクタ31から注入された試料は、カラム33で分離され、キャリア溶液により運ばれ、検出器25のフローセル内で試薬溶液と合流、反応して発光し、流出液として排出された。この時の発光量をホトンカウンターで測定した。

【0030】試料としては、表1及び表2に示したアルカロイド、抗生物質、医薬品、基本的な脂環式三級アミ\*

\*ン等を用い、スバルテイン(sparteine)を100とする相対化学発光強度として示した。また、高い発光強度を示すpH範囲に\*を付して示した。

【0031】なお、いくつかの含窒素化合物については、相対化学発光強度に対するpHの影響を図5(N-メチルピロリジンで100とする)、図6(リンコマイシンで100とする)に示した。

【0032】また、いくつかの含窒素化合物について、検出下限値および直線性上限値を表3に示した。ここで、検出下限値は、外部環境ノイズの3倍の発光ピーク高さの量を示した。また、直線性上限値は、絶対量と発光ピーク高さとの原点を通る直線上にのる上限値を示した。

【0033】

【表1】

化 合 物	相対化学 発光強度	最強pH範囲		
		3-5	5-7	7-9
アトロピン(Atropine)	40			*
トロピン(Tropine)	30			*
ホマトロピン(Homatropine)	38			*
スコポラミン(Scopolamine)	110			*
ニコチン(Nicotine)	70		*	
ブルシン(Brucine)	10		*	
シンコニジン(Cinchonidine)	8		*	
シンコニン(Cinconine)	11		*	
キニジン(Quinidine)	5		*	
スバルテイン(Sparteine)	100		*	
エメチン(Emetine)	800000	*		
ストリキニン(Strychnine)	94			*
ヨヒンビン(Yohimbine)	200	*		
ソラニジン(Solanidine)	55			*
アコニチン(Aconitine)	110			*
アレコリン(Arecoline)	411			*
エルゴタミン(Ergotamine)	30			*
フィソスチグミン(Physostigmine)	2	*		
リンコマイシン(Lincomycin)	62			*
マイトマイシン(Mitomycin)	30		*	
エリスロマイシン(Erythromycin)	44		*	
ペニシリンG(Penicilline G)	12		*	

【表2】

【0034】

化 合 物	相対化学 発光強度	最強pH範囲		
		3-5	5-7	7-9
セファロチン(Cephalotine)	13		*	
キヌグリドール(Quinuclidol)	5			
ジフェニドール(Diphenidol)	72			
コチニン(Cotinine)	33			

N-エチルモルホリン	65	
N-メチルピロリジン	190	*
N-エチルピペリジン	43	*

【0035】

【表3】

化 合 物	検出下限値(pmol)	直線性限界値(pmol)
N-エチルピペリジン	1.8	15000
N-メチルピロリジン	0.7	7500
N-エチルモルホリン	0.8	400
スバルティン	0.5	120

## 【0036】実施例2

図3に示した装置を用いて脂式二級アミンを検出した。二級アミンの例として、ピペリジンおよびピロリジンの溶液それぞれにビニルメチルケトンを加え、5分間放置して三級アミンとした。これを試料溶液としてインジェクタ31に供給した。数2のように5分以内に速やかに反応し、対応する三級アミンを生成し、実施例1と同様にして化学発光検出ができた。

## 【0037】実施例3

HPLCのポストカラム検出法に本発明方法を応用してスバルティンを検出した。

【0038】図4に示した装置を用い、試薬溶液としてトリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム(II)塩酸塩[Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]を10mM硫酸に溶解して0.3mMとしたものを、0.3ml/minで送液して電解反応器23に供給し、80μAで連続的に定電流電解してRu(II)をRu(III)に酸化し、検出器25(実施例1)に同じに供給した。

【0039】スバルティン20pmol、除蛋白した血漿をそれぞれカラム33に注入した。カラム33としては、CAPCELL PAK, C18 (250mm×内径4.6mm)を45℃で用いた。溶離液(移動相溶媒)として、10mMオクタンスルホン酸ナトリウムを含む0.1M-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>水溶液(pH:4.0)とアセトニトリルとの混液(6:4, v/v)を0.7ml/minで送液し、カラム33からの流出液を検出器25に供給した。

【0040】検出器25でのクロマトグラムは図7(縦軸が相対化学発光強度)の通りであり、HPLCで分離することにより、血漿中のスバルティンを検出できることが判る。

【0041】図7(A):スバルティン(20pmol)のクロマトグラム

図7(B):スバルティン+除蛋白血漿のクロマトグラム(8pmol/20μl)。siで示したのがスバルティンのピーク

図7(C):除蛋白血漿のクロマトグラム

## 【0042】実施例4

HPLCのポストカラム検出法に本法を適用してリンコマイシンを検出した。実施例3と同様にして、試薬溶液

を電解酸化し、検出器25に供給した。

【0043】リンコマイシン40pmol、除蛋白した血漿20μlにリンコマイシン8pmolを添加したもの、除蛋白した血漿をそれぞれカラム33に注入した。カラム33としては、Chemcosorb ODS-H (50mm×内径4mm)を45℃で用いた。溶離液として、10mM-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH3.7)とメタノールとの混液(85:15, v/v)を0.5ml/minで送液し、カラム33からの流出液を検出器25に供給した。

【0044】検出器25でのクロマトグラムは図8(縦軸が相対化学発光強度)の通りであり、HPLCで分離することにより、血漿中のリンコマイシンを検出できることが判る。

【0045】図8(A):リンコマイシン(40pmol)のクロマトグラム

図8(B):リンコマイシン+除蛋白血漿のクロマトグラム(8pmol/40μl)。siで示したのがリンコマイシンのピーク

図8(C):除蛋白血漿のクロマトグラム

## 【0046】実施例5

図3に示した装置を用い、試薬溶液として0.24mM-Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を含む10mM-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を、0.3ml/minで電解反応器23に供給し、80μAで連続的に定電流電解してRu(II)をRu(III)に酸化し、検出器25(実施例1に同じ)に供給した。

【0047】一方、後記表4に示した各種インドール化合物を水に溶解し試料溶液とした。キャリア溶液として10mM-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-アセトニトリル混液(1:1, v/v)を0.3ml/minで送液し、インジェクタ31を介して試料溶液を注入して検出器25に供給し、この時の発光量をホトンカウンターで計測し、インドール(R=H)を100とする相対化学発光強度として示した。

【0048】なお、トリプトファン(R=CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH)は、200pmolまでは絶対量と発光強度(ピーク高さ)とは原点を通る直線関係を示し、検出下限値(環境ノイズの3倍の発光強度ピーク高さ)は0.1pmolであった。

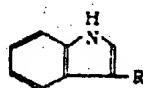
## 【0049】

【表4】

表4: インドール化合物の化学発光強度

Rの置換基 <sup>a)</sup>	相対化学発光強度
H	100
CHO	17
OCOCH <sub>3</sub>	125
COOH	8
CH <sub>2</sub> COOH	133
CH <sub>2</sub> COCOOH	125
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	25
CH <sub>2</sub> CH(OH)COOH	17
CH <sub>2</sub> CH(NH <sub>2</sub> )COOH	333
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	25
CH <sub>2</sub> CH(NH <sub>2</sub> )COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	33

\*1



## 【0050】実施例6

HPLCのポストカラム検出法に本法を適用し、トリプトファンを検出した。図4の装置を用い、トリプトファン(Trp) 40pmol、 $\alpha$ -メチルトリプトファン( $\alpha$ -Trp) 80pmol、7-メチルトリプトファン(7m- $\alpha$ -Trp) 80pmolおよびインドール酢酸(IAA) 200pmolを、カラム33に注入した。逆相イオンペアクロマトグラフィーを採用し、カラム33としてChemcosorb ODS-LH(150mm×内径4mm)を50℃で用いた。

【0051】溶離液(移動相溶媒)として3.7mM-オクタンスルホン酸ナトリウムを含む10mM-リン酸とアセトニトリルとの混液(3:1, v/v)を1.0ml/minで送液した。一方、実施例5と同じ試薬溶液を同様にして検出器25に送液した。得られたクロマトグラムは、図9(A)に示した通りである。

【0052】一方、ヒトの尿を上記と同じカラム33に注入し同様にしてクロマトグラムを求めた(図9(B))。これから、ヒトの尿の如き混合物から、トリプトファン(Trp)およびインドール酢酸(IAA)が高い選択性で検出されることが判り、他の共存物との分離も良好であった。ヒトの尿では $5.6 \mu\text{M} \pm 1.57$  (Ave.  $\pm$  S.D.)であった。

## 【0053】実施例7

HPLCのポストカラム検出法に本法を適用し、トリプトファンのD体およびL体を検出した。

【0054】DL体の相互分離には、配位子交換クロマトグラフィーを採用した。カラム33はDevelosil ODS-7(50mm×内径4mm)を40℃で用い、溶離液は8mM-D-フェニルアラニン、4mM-Cu(2価イオン)とメタノールとの混液(85:15, v/v)を1.0ml/minで送液した。他は実施例6と同様にして処理した。

【0055】図10(A)にDL-トリプトファンをそれぞれ25pmolの混合物を分離したクロマトグラムを示す。

【0056】また、ヒトの血漿を過塩素酸で除蛋白した上清のクロマトグラムの発光強度を示す(図10(B))。L体の溶出位置に発光ピークが認められ、この例ではD体溶出位置にピークは検出されていない。また、L-アミノ酸製剤等に確認したところ、必ずしもL体のみではないことが確認され、本システムのようにL体のみ(あるいはD体)を選択的に測定できることは有効なことである。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、スバルテイン(Sparteine)の構造式を示す図である。

【図2】図2はリンコマイン(Lincomycin)の構造式を示す図である。

【図3】図3は本発明の実施するための装置の一例を示す説明図である。

【図4】図4は、HPLCのポストカラム検出法として本発明を実施するための装置の一例を示す説明図である。

【図5】図5は、pHと相対化学発光強度との関係を示すグラフである。

【図6】図6は、pHと相対化学発光強度との関係を示すグラフである。

【図7】図7は、ポストカラム検出HPLCのクロマトグラムである。

【図8】図8は、ポストカラム検出HPLCのクロマトグラムである。

【図9】図9は、ポストカラム検出HPLCのクロマトグラムである。

【図10】図10は、ポストカラム検出HPLCのクロマトグラムである。

## 【符号の説明】

11 ポンプ

13 ポンプ

50 15 ダンパーチューブ

17 ダンパーチューブ

21 安定化直流電源

23 電解反応器

25 検出器

27 レコーダ

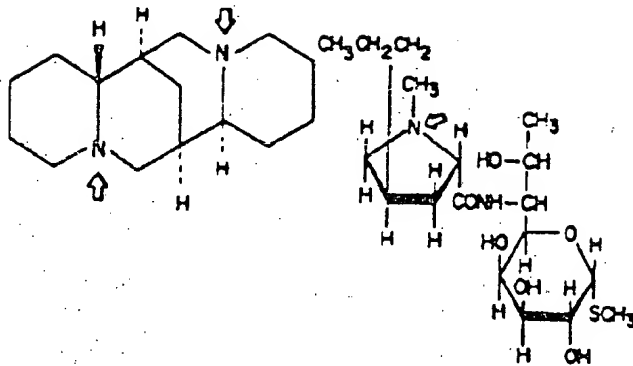
31 インジェクタ

33 カラム

41 ポンプ

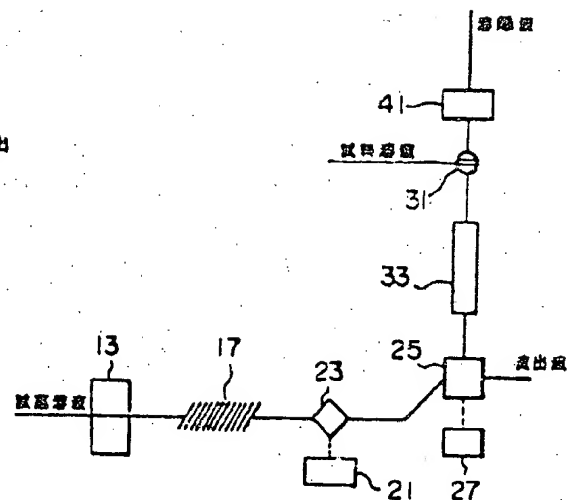
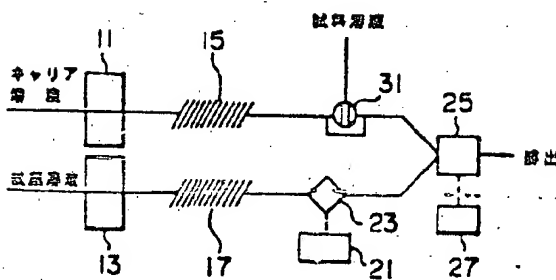
【図1】

【図2】

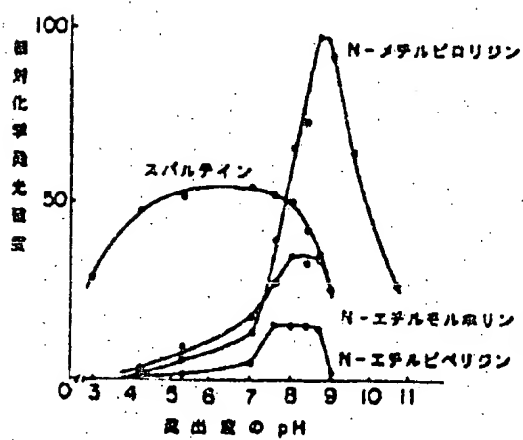


【図3】

【図4】

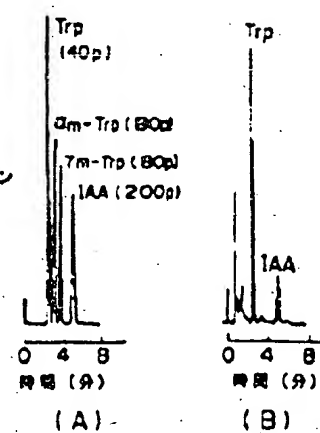
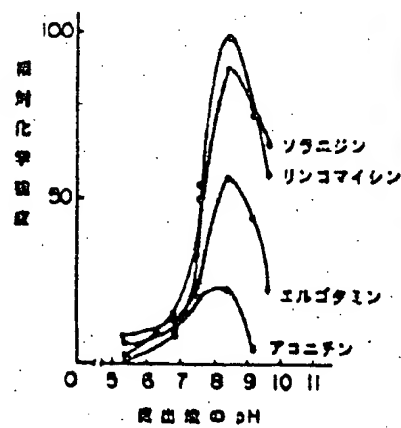


【図5】



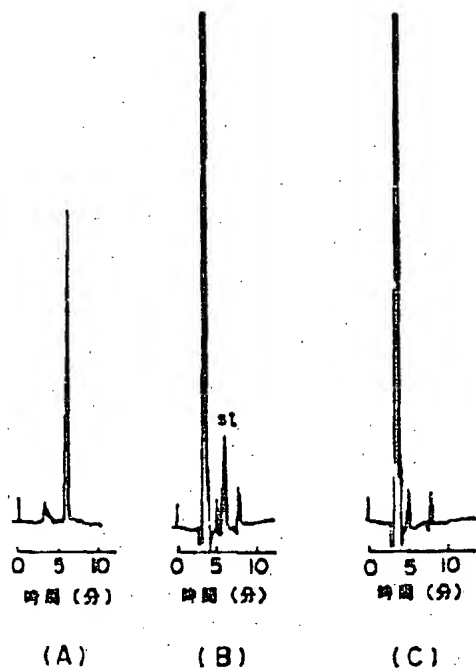
【図6】

【図9】

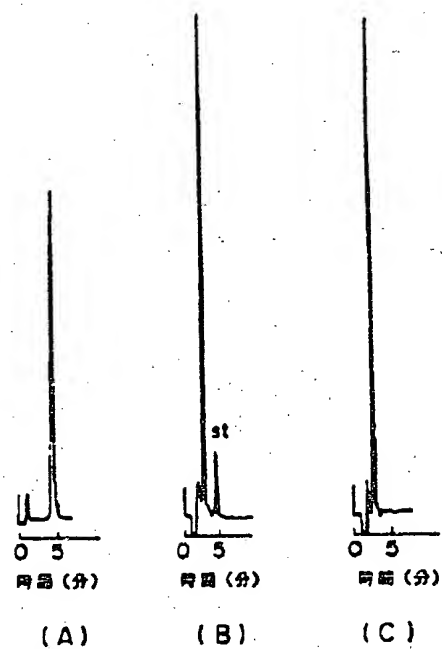




【図7】



【図8】



【図10】

